

AZ ANGIOTENZIN IV NEUROMODULÁCIÓ ÉS AZ AT4R/IRAP EXPRESSZIÓ VIZSGÁLATA A PREFRONTÁLIS KÉREGBEN

Doktori tézisek

Dr. Papp Zsolt Tamás

Semmelweis Egyetem

Gyógyszertudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Köles László, egyetemi adjunktus, Ph.D.

Hivatalos bírálók: Dr. Szőke Éva, egyetemi tanár, MTA doktora
Dr. Ruisanchez Éva, egyetemi adjunktus, Ph.D.

Komplex vizsga szakmai bizottság:

Elnök: Dr. Szőkő Éva, egyetemi tanár, MTA doktora

Tagok: Dr. Gyurasics Ágnes, főosztályvezető, Ph.D.

Dr. Benyó Zoltán, egyetemi tanár, Ph.D.

Budapest

2025

1. Bevezetés

1.1. A prefrontális kéreg

A prefrontális kéreg (PFC) egésze citoarchitektóniai szerkezetét tekintve hat rétegű isocortex, az orbitomediális része (mPFC) agranuláris kéreg, jól fejlett V-VI. réteggel. Neurokémiai szempontból a központi idegrendszer (KIR) legtöbb neurotranszmittere, például a glutamát, megtalálható itt, illetve szabályozó szereppel sokféle neuropeptidet, például az angiotenzineket, is leírtak. Funkcionálisan a nagyagy három asszociációs kéregrészének egyike, végrehajtó, tág értelemben vett motoros kéreg. Fiziológiásan szerepe van az összetett és/vagy új, célra irányuló mozgások tervezésében, szervezésében, végrehajtásához szükséges, belső reprezentációra irányuló fenntartott figyelemben és a döntéshozásban. Mivel az öregedési folyamatok, atrophia először ezen az agyterületen jelentkeznek és patológiás folyamatokra, neurodegenerációra a vulnerabilitás itt a legnagyobb, nagy klinikai jelentőséggel is bír. Neuropszichitátriai implikációi elsősorban a demenciák, illetve a szkizofrénia. Egyik betegség esetén sincs, előfordulásuk gyakorisága, illetve lefolyásuk súlyossága ellenére, a gyógyszeres terápia teljes mértékben máig sem megoldva.

1.2. A glutamáterg rendszer: glutamát és NMDA

A glutamáterg rendszer a KIR fő serkentő hálózata.

A **glutamát** egy klasszikus excitátoros neurotranszmitter. 3 féle ionotrop receptora, az AMPA, kainát és NMDA receptor, illetve 8 féle metabotrop receptora, az mGluR1-8, ismeretes.

Az **NMDA** receptorok négy alegységből épülnek fel, középen ioncsatornát fogva közre. Funkció terén mind az aktivációja, mind a hatásmechanizmusa eltér egy átlagos ligandfüggő ioncsatornától. A ligandfüggő receptorokat általában egy agonista aktiválja, mely jelen esetben is megvan, nevezetesen a GluN2 alegységen található ortosztérikus kötőhelyhez kapcsolódó glutamát, illetve további szubsztrátok az aszpartát, homocisztein és NMDA is. Ezenfelül olykor előfordulhat koagonista szükségessége. Itt a glicin és D szerin a koaktivátorok, amiknek a GluN1 és GluN3 alegységen van kötőhelyük. Az NMDAR-nak a megszokottnál több allosztérikus kötőhelye van. Legfőbb egyedülállósága viszont feszültségfüggő mivolta. Nyugalmihoz közeli membránpotenciálon már igen kis koncentrációjú Mg^{2+} is blokkolja a csatornát, melyet a depolarizáció megszüntet, lehetővé téve és fokozva az ionáramlást. Ilyen módon az NMDA receptor képes detektálni és integrálni a preszinaptikus és posztzinaptikus aktivitásokat. Az NMDA receptorok viszont nem csak Na^+ -ra, hanem Ca^{2+} -ra is permeábilisek, így a mindkét ion által kifejtett, gyors és rövid ideig tartó depolarizáló hatáson túl, a Ca^{2+} , mint másodlagos hírvivő, a Ca^{2+} /kalmodulin kinázt (CaMK) aktiválva lassabban létrejövő, viszont a kináz autofoszforylációja révén a Ca^{2+} szint normalizálódása után is fennmaradó hatások kialakítására is képes. A kinázok és foszforilázok különböző makromolekulákat módosítanak, foszforilálnak vagy defoszforilálnak, a konduktanciájukat vagy denzitásukat befolyásolva. Az így kialakuló hosszú távú potenciáció és depresszió (LTP, LTD) áll a háttérben a szinaptikus plaszticitásnak, a tanulásnak és a memóriának, magának a kogníciónak. A glutamáterg rendszer túlműködése, az NMDAR túlaktivációja excitotoxikus hatású, stimulálja a Ca^{2+} -függő sejthalálútvonalakat, sejszinten apoptózist, szervszinten pedig neurodegenerációt vált ki.

1.3. A renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer: Ang IV és AT4R/IRAP

A szisztémás **renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer** (RAAS) klasszikus tengelye (angiotenzinogén/renin/Ang I/ACE/Ang II/AT1R) régóta ismert. Az elmúlt évtizedekben új, lokális (köztük agyi) renin-angiotenzin rendszerek (RAS), illetve új RAS tengelyek (köztük az Ang III/APN/Ang IV/IRAP/AT4R) váltak ismertté.

Az oktapeptid Ang II-ről az AP-A hasítja le az N terminális aszpartátot, majd a képződött heptapeptid Ang III-ról az AP-N vágja le az N terminális arginint, végül egy hexapeptidet, az **Ang IV**-t eredményezve.

Habár már a kilencvenes évek elején azonosítottak egy unikális angiotenzin kötőhelyet, az **angiotenzin IV receptort** (AT4R), amelyhez az Ang IV telíthetően, reverzibilisen, specifikusan és nagy affinitással kötődik, működéséről, sőt mibenlétéről, mindmáig sincs konszenzus. A legelfogadottabb nézet szerint az AT4R-t egy transzmembrán enzimmal, az **IRAP**-pal azonosították, az Ang IV-t pedig a katalitikus domén potens, kompetitív inhibitoraként. Az Ang IV tehát extracellulárisan, a különböző neuroaktív peptidek metabolizmusának gátlásával, koncentrációjának növelésével fejtheti ki hatását. Az **AT4R**-on egy allosztérikus kötőhelyet is felfedeztek, ahol az Ang IV hagyományos agonistaként viselkedik. Az Ang IV hatása így különböző intracelluláris jelátviteli útvonalak beindításával jöhet létre. Legújabban az Ang IV és a **HGF** között számos hasonlóságot mutattak ki, illetve az AT4R-t a HGF receptorával, a c-Met-tel is azonosították. Habár az Ang IV fiziológiás koncentrációban nagyon kis affinitással kötődik az **AT1R**-hoz, magas koncentrációban képes azt is aktiválni.

A **radioaktívan megjelölt** Ang IV agyi **kötődését** számos fajban vizsgálták. Patkány, egér, tengeri malac, futóegér, makákó, rézuszmajom és ember agyi képleteiben, köztük a nagyagykérgében mutatták ki. Magas fokú fajközi konzerváltságot figyeltek meg. Ezzel szemben az AT4R/IRAP **fehérje szintű expressziója** alig kutatott. Patkány és ember agyában, neocortexében mutatták ki. A különböző módszerek eredményei átfedtek egymással. Az AT4R/IRAP **mRNS szintű kifejeződését** viszont még egyáltalán nem publikálták.

Az Ang IV és analógjai **egészséges állatokban** elvégzett különböző viselkedésteztekben jótékony hatással voltak a megjegyző, megtartó és felidéző memóriára. Valamint a **memória deficit állatmodellekben** javították vagy visszafordították az emlékezetzavarokat.

Az Ang IV **interakcióját** számos neurotranszmitterrel és neuromodulátorral kapcsolatban tanulmányozták már. Ellenben az Ang IV, illetve a glutamát és az NMDAR interakciója alig kutatott, az is csak a hippocampusz területén, patkányban.

Az Ang IV-gyel kapcsolatos **elektrofiziológiai** vizsgálatok a hippocampuszra, a CA1 régióra fókuszáltak. Azonban az Ang IV-t érintő patch clamp kísérleteket a prefrontális kéregben még nem publikáltak.

2. Célkitűzés

Célunk a glutamáterg rendszer, az NMDA receptorok angiotenzinerg neuromodulációjának vizsgálata a PFC V. sejtrétegében található piramidális neuronokon.

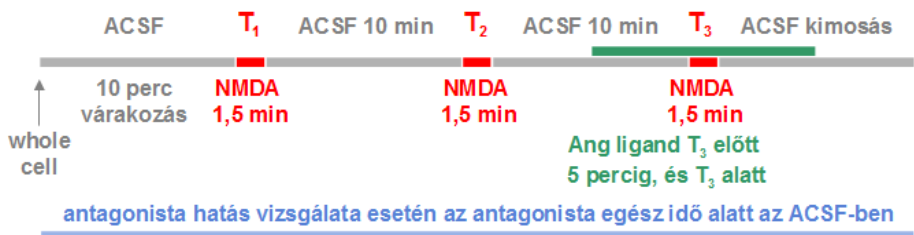
Munkacsoportunk korábbi vizsgálataink során az Ang II magasabb koncentrációinak NMDA receptorokra kifejtett negatív modulációját mutatta ki, melyet sem AT1R, sem AT2R antagonistá adása nem függesztett fel. Feltételeztük, hogy a gátlás egy Ang II-ből képződő másik RAS ligandon, az Ang IV-n és saját receptorán, az AT4R/IRAP-on keresztül jött létre.

PhD munkám, saját kutatásaim konkrét célja az Ang IV negatív moduláló hatásának megerősítése, szignáltranszdukciójának és konnektivitásának tisztázása, illetve az AT4R/IRAP sejt specifikus lokalizációjának feltérképezése. Szélesebb kontextusban a prefrontális cortex fiziológias működésének, illetve a régiót érintő neurológiai és pszichiátriai betegségek patomechanizmusának celluláris szintű megértése, terápiás céltargetek keresése.

3. Metodika

3.1. Elektrofiziológia

Az elektrofiziológiai vizsgálatokhoz 9-12 napos Wistar patkányok agyából 200 μm vastagságú frontális szeleteket készítettünk. Az mPFC piramissejtjeit vizuálisan azonosítottuk. Whole-cell voltage-clamp konfigurációt hoztunk létre, a membránpotenciált -70 mV -on tartottuk. A rendszert 10 percig nyugalomban hagytuk. Utána 10 percenként, három alkalommal, másfél percig 30 μM NMDA tartalmú ACSF-t áramoltattunk. Az Ang II-t T_3 előtt 5 perccel és T_3 alatt adtuk. A kísérlet folyamán a feltételezett neuromodulátorokat T_3 előtt 5 perccel és T_3 alatt adtuk, amikor a neuromodulátor antagonistájával is dolgoztunk, az a teljes mérés alatt jelen volt az ACSF-ben. Kontroll kísérleteink azt mutatták, hogy az áramok T_3/T_2 viszonylatban stabilak, ezért továbbiakban eredményeinket ebben az összefüggésben vizsgáltuk és T_3/T_2 hányadosként ábrázoltunk. Meghatároztunk egy kizárási kritériumot a kontrollcsoportok átlagából, az átlagok standard hibájából (SEM) és a 99,9%-os konfidencia intervallumból. A határérték 10-15% körül mozgott. Ennek megfelelően a különböző csoportok esetében hatásnak a T_3/T_2 arány $\pm 10\text{-}15\%$ -os eltérését tekintettük a vonatkozó kontrollcsoporthoz képest. Statisztikai analízist Kruskal-Wallis egyutas ANOVA és post-hoc Bonferroni teszttel végeztünk. A p -érték $\leq 0,05$ -öt tekintettük szignifikánsnak.



1. ábra. Az elektrofiziológiai vizsgálatoknál alkalmazott mérési protokoll.

3.2. Immunhisztokémia

A immunhisztokémiai vizsgálatokhoz 10 napos és 6 hónapos Wistar patkányok agyát *in vivo* fixáltuk, 10%-os formalint, majd PBS-t perfundáltatva közvetlenül a még verő szíven, az érrendszeren keresztül. A szerveket paraffinba ágyztuk és 4 µm-es szeleteket metszettünk belőlük. A deparaffinizálást, rehidratálást követően citromsavval hőindukált epitópvisszanyerést hajtottunk végre, míg az endogén peroxidáz aktivitást 3%-os H₂O₂-vel gátoltuk, végül szérumblokkolóban inkubáltuk. A metszeteket az 1. táblázatban szereplő elsődleges antitesttel vagy izotípus-kontrollal, majd másodlagos ellenanyag kombinációkkal festettük, végül DAPI-val ellenfestettük. A mintákat Leica SP8 konfokális mikroszkóppal felvételeztük.

1. táblázat. Az immunhisztokémiai vizsgálatoknál használt elsődleges ellenanyag, kontroll és másodlagos ellenanyag kombinációk.

Kor	Sejt-típus marker	Elsődleges ellenanyag kombinációk	Kontroll kombinációk	Másodlagos ellenanyag kombinációk
10 nap	Ø	AGTR1 (MBS151548) nyúl pEa (MyBioSource)	AGTR1 (MBS151548) nyúl pEa + AGTR1 blokkoló peptid (MBS152017) (MyBioSource)	SignalStain Boost IHC Detection Reagens, nyúl + TSA-FITC (Vector Laboratories) (Akoya Biosciences)
10 nap	Ø	IRAP (D2C5)XP® nyúl mEa (Cell Signaling Technology)	Nyúl IgG (31235) izotípus kontroll (Invitrogen)	SignalStain Boost IHC Detection Reagens, nyúl + TSA-FITC (Vector Laboratories) (Akoya Biosciences)
6 hónap	Ø	IRAP (D2C5)XP® nyúl mEa (Cell Signaling Technology)	Nyúl IgG (31235) (Invitrogen)	SignalStain Boost IHC Detection Reagens, nyúl + TSA-FITC (Vector Laboratories) (Akoya Biosciences)
10 nap	GABAerg interneuron	IRAP (D2C5)XP® nyúl mEa (Cell Signaling Technology) GAD67 (1G10.2) egér mEa (Sigma-Aldrich)	Nyúl IgG (31235) (Invitrogen) Egér IgG2a (02-6200) (Invitrogen)	SignalStain Boost IHC Detection Reagens, nyúl + TSA-FITC (Vector Laboratories) (Akoya Biosciences) SignalStain Boost IHC Detection Reagens, egér + TSA-Cy3 (Vector Laboratories) (Akoya Biosciences)
10 nap	Astrocyta	IRAP (D2C5)XP® nyúl mEa (Cell Signaling Technology) GFAP (G3893) egér mEa (Sigma-Aldrich)	Nyúl IgG (31235) (Invitrogen) Egér IgG1 (MA1-10407) (Invitrogen)	SignalStain Boost IHC Detection Reagens, nyúl + TSA-FITC (Vector Laboratories) (Akoya Biosciences) SignalStain Boost IHC Detection Reagens, egér + TSA-Cy3 (Vector Laboratories) (Akoya Biosciences)
10 nap	Microglia	IRAP (D2C5)XP® nyúl mEa (Cell Signaling Technology) Iba1 (GT10312) egér mEa (Invitrogen)	Nyúl IgG (31235) (Invitrogen) Egér IgG1 (MA1-10407) (Invitrogen)	SignalStain Boost IHC Detection Reagens, nyúl + TSA-FITC (Vector Laboratories) (Akoya Biosciences) SignalStain Boost IHC Detection Reagens, egér + TSA-Cy3 (Vector Laboratories) (Akoya Biosciences)
6 hónap	GABAerg interneuron	IRAP (D2C5)XP® nyúl mEa (Cell Signaling Technology) GAD67 (1G10.2) egér mEa (Sigma-Aldrich)	Nyúl IgG (31235) (Invitrogen) Egér IgG2a (02-6200) (Invitrogen)	SignalStain Boost IHC Detection Reagens, nyúl + TSA-FITC (Vector Laboratories) (Akoya Biosciences) Anti-egér IgG Fab2 Alexa Fluor ® 555 (Cell Signaling Technology)
6 hónap	Astrocyta	IRAP (D2C5)XP® nyúl mEa (Cell Signaling Technology) GFAP (G3893) egér mEa (Sigma-Aldrich)	Nyúl IgG (31235) (Invitrogen) Egér IgG1 (MA1-10407) (Invitrogen)	SignalStain Boost IHC Detection Reagens, nyúl + TSA-FITC (Vector Laboratories) (Akoya Biosciences) Anti-egér IgG Fab2 Alexa Fluor ® 647 (Cell Signaling Technology)
6 hónap	Microglia	IRAP (D2C5)XP® nyúl mEa (Cell Signaling Technology) Iba1 (GT10312) egér mEa (Invitrogen)	Nyúl IgG (31235) (Invitrogen) Egér IgG1 (MA1-10407) (Invitrogen)	SignalStain Boost IHC Detection Reagens, nyúl + TSA-FITC (Vector Laboratories) (Akoya Biosciences) Anti-egér IgG Fab2 Alexa Fluor ® 555 (Cell Signaling Technology)

3.3. Molekuláris biológia

A molekuláris biológiai vizsgálatához 10 napos, 3 hónapos és 6 hónapos patkány mPFC-ket QIAzolban lizáltunk és homogenizáltunk. A szövettörmeléből kloroformmal egy tiszta, vizes fázist választottunk külön, majd isopropanollal RNS-pelletet precipitáltunk. Az RNS hozamot spektrofotométerrel határoztuk meg. Az esetlegesen jelenlévő DNS szennyeződéseket DNáz enzimatis emésztéssel távolítottuk el. A minták RNS tartalmát reverz transzkripcióval cDNS-re fordítottuk, majd nem kvantitatív PCR-rel amplifikáltuk. A primereket az NCBI Primer-BLAST eszközzel terveztük. Végül a terméket agaróz gél elektroforézissel futtattuk és a DNS sávokat UV átvilágító asztalon detektáltuk.

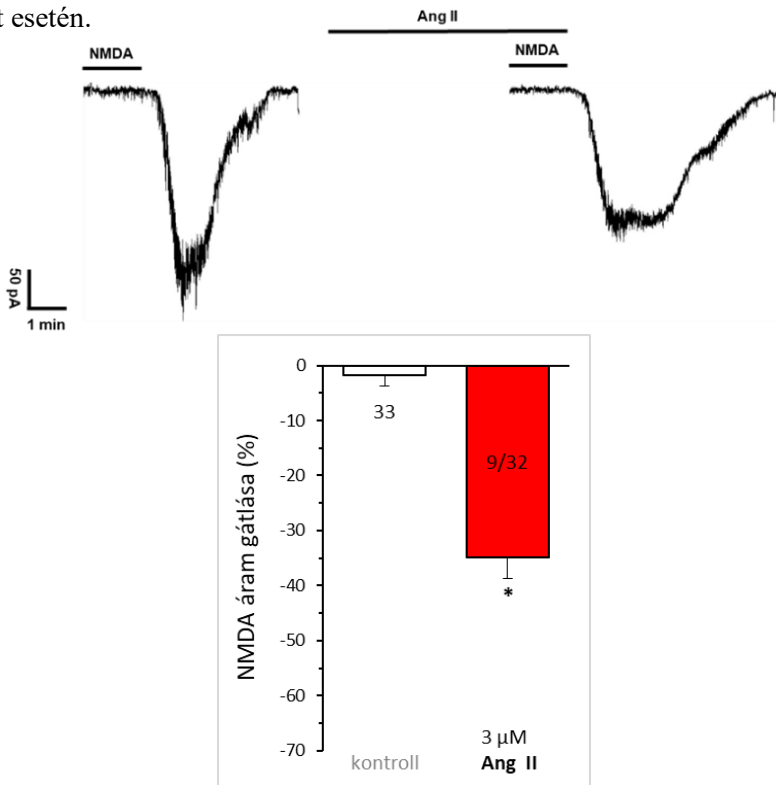
2. táblázat. Az PCR vizsgálatnál használt forward és reverz primerek.

Géne név	Gén ID	Forward primer	Reverse primer
Lnpep	171105	5'-TGA GCA CAT ACC TGG TTG CT-3'	5'-GGA ATG GCC ACC AGA TCC AAT-3'

4. Eredmények

4.1.1. Az Ang II gátló hatást fejt ki az NMDA áramokra a PFC V. réteg piramiseltjein

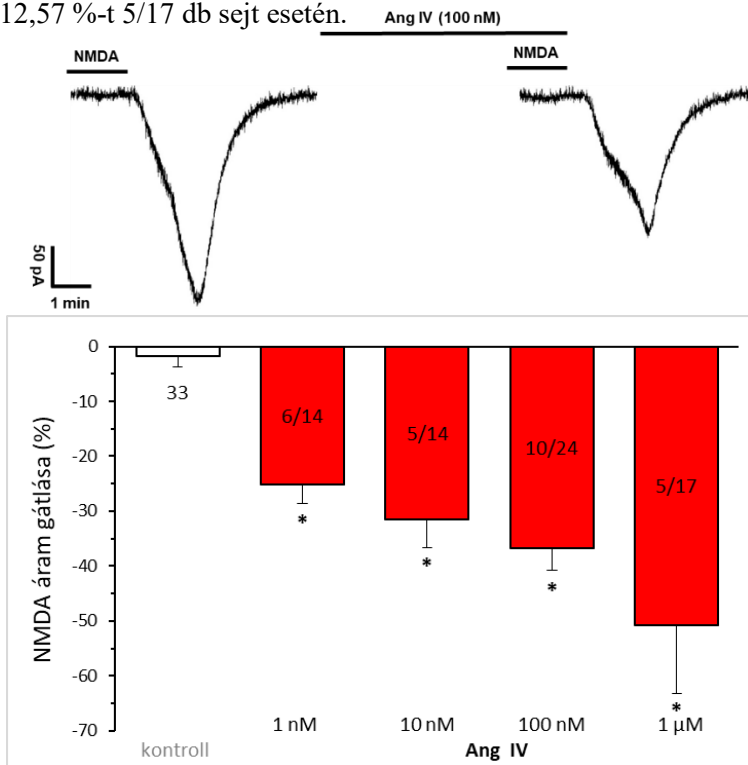
Az Ang II fiziológiásat meghaladó koncentrációban gátolja az NMDA áramokat 9-12 napos patkány PFC V. rétegében, a piramiseltjek egy csoportjában. 3 μM -s koncentrációnál átlagosan $65,04 \pm 3,77$ %-s T_3/T_2 arányt észleltünk 9/32 db sejt esetén.



2. ábra. Az Ang II (3 μM) gátló hatása az NMDA áramokra a PFC V. réteg piramiseltjeiben, 9-12 napos patkányban. Fent: membrán kationáramok reprezentatív áramerősség-idő grafikonja. Lent: A T_3 -nál mért válaszokat a T_2 -nél mérthez normalizáltuk. n kísérlet átlaga $\pm$ SEM. A fehér oszlopokon (kontroll) az összes vizsgált sejt, a piros oszlopokon (Ang II) a reagáló sejtek száma látható. p a szignifikanciát jelöli, * $p < 0,01$.

4.2.1. Az Ang IV gátló hatást fejt ki az NMDA áramokra a PFC V. réteg piramissejtjein

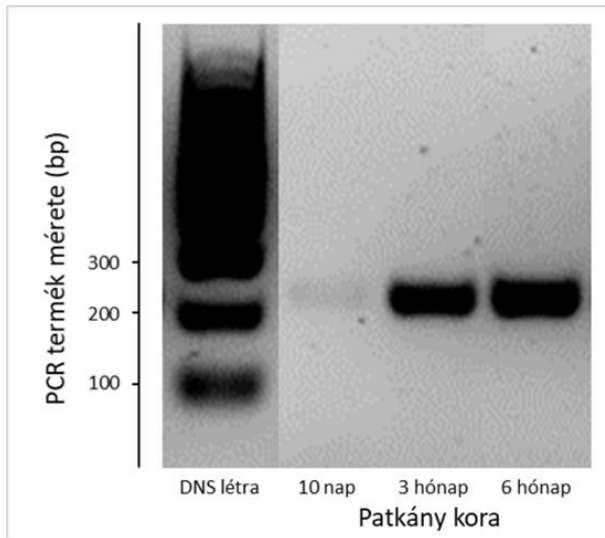
Az Ang IV gátolja az NMDA áramokat 9-12 napos patkány PFC V. rétegében, a piramissejtek egy csoportjában. 1 nM-s koncentrációnál átlagosan $74,78 \pm 3,41$ %-s T_3/T_2 arányt észleltünk 6/14 db, 10 nM-nál $68,40 \pm 5,04$ %-t 5/14 db, 100 nM-nál $63,29 \pm 4,14$ %-t 10/24 db, 1 μ M-nál $49,31 \pm 12,57$ %-t 5/17 db sejt esetén.



3. ábra. Az Ang IV különböző koncentrációinak (1 nM - 1 μ M) gátló hatása az NMDA áramokra a PFC V. réteg piramissejtjeiben, 9-12 napos patkányban. Fent: membrán kationáramok reprezentatív áramerősség-idő grafikonja. Lent: A T_3 -nál mért válaszokat a T_2 -nél mérthez normalizáltuk. n kísérlet átlaga $\pm$ SEM. A fehér oszlopokon (kontroll) az összes vizsgált sejt, a piros oszlopokon (Ang IV) a reagáló sejtek száma látható. p a szignifikanciát jelöli, * $p < 0,01$.

4.2.2. Az AT4R/IRAP mRNS szinten expresszálódik a PFC-ben

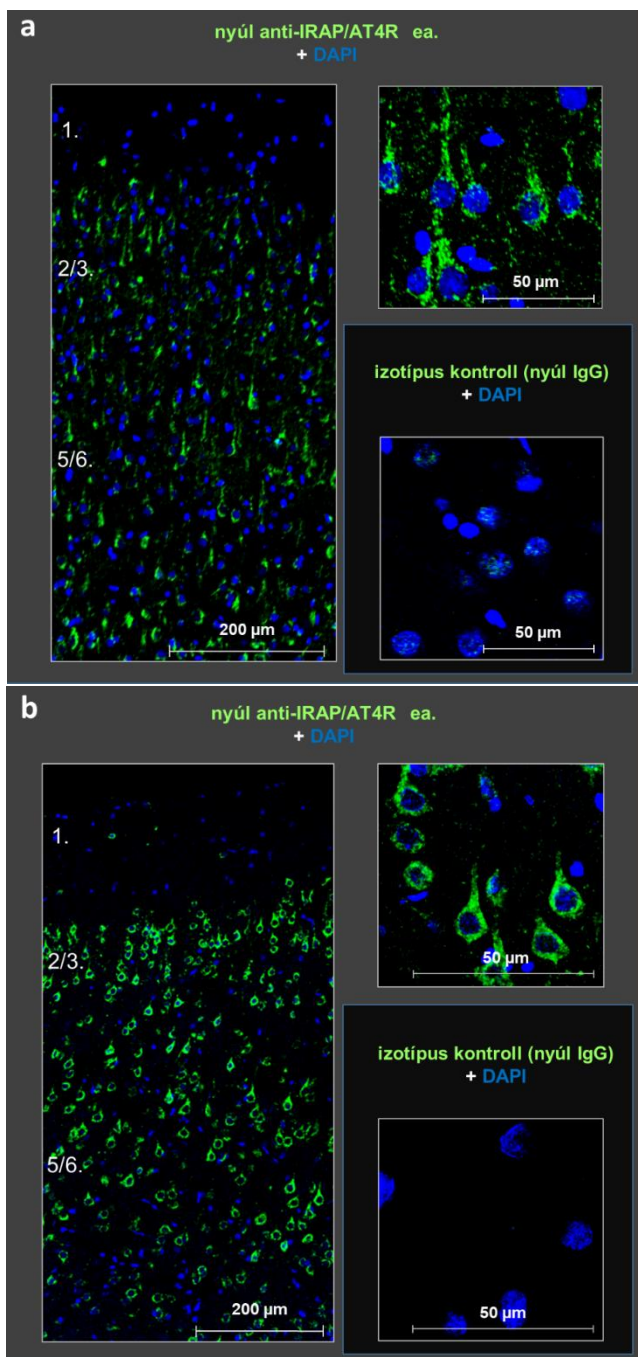
Molekuláris biológiai vizsgálatokkal kimutattuk az AT4R/IRAP-t kódoló nukleinsav jelenlétét 10 napos, 3 hónapos és 6 hónapos patkányok PFC-jében. Az előbbi korcsoportban jelzett, utóbbiakban kifejezett expresszió volt megfigyelhető.



4. ábra. Az AT4R/IRAP mRNS szintű expressziója 10 napos, 3 hónapos és 6 hónapos patkány PFC-ben. A molekuláris biológiai vizsgálatnál a nem kvantitatív PCR terméket agaróz gélelektroforézissel detektáltuk.

4.2.3. Az AT4R/IRAP fehérje szinten expresszálódik a PFC-ben

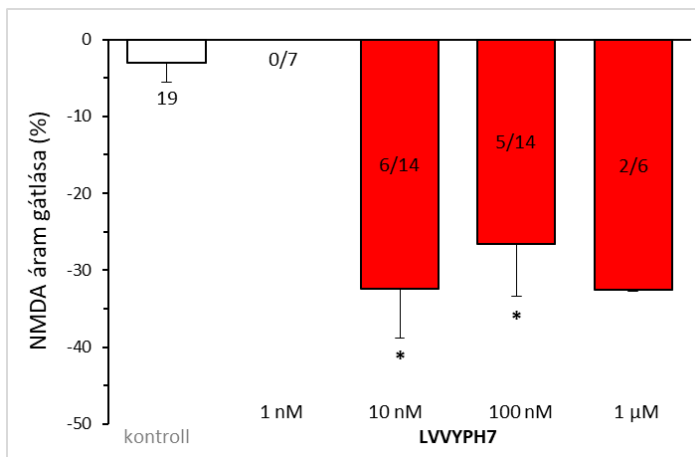
Immunhisztokémiai vizsgálatokkal kimutattuk az IRAP/AT4R jelenlétét 10 napos és 6 hónapos patkányok PFC-jében. Markáns expresszió volt megfigyelhető a II-III. és az V-VI. sejtrétegekben, illetve az V. réteg piramis morfológiájú sejtjeiben.



5. ábra. Az AT4R/IRAP fehérje szintű expressziója (a) 10 napos és (b) 6 hónapos patkány PFC-ben. Az immunhisztokémiai vizsgálatnál az IRAP/AT4R megjelenítésére anti-IRAP/AT4R nyúl poliklonális antitestet, kontrollnak nyúl IgG-t, ellenfestésként DAPI-t használtunk. (bal) A PFC egésze. A számok a PFC rétegeit mutatják. Mérték: 100 μ m. Markáns expresszió a II-III. és az V-VI. sejt rétegekben. (jobb felső) A PFC ötödik rétege. Mérték: 50 μ m. Markáns expresszió piramis morfológiájú sejtekben. (jobb alsó) A PFC ötödik rétege. Mérték: 50 μ m. Izotípus kontroll.

4.2.4. Egy másik IRAP inhibitor, az LVVYP H7 utánozza az Ang IV NMDA áramokra kifejtett gátló hatását

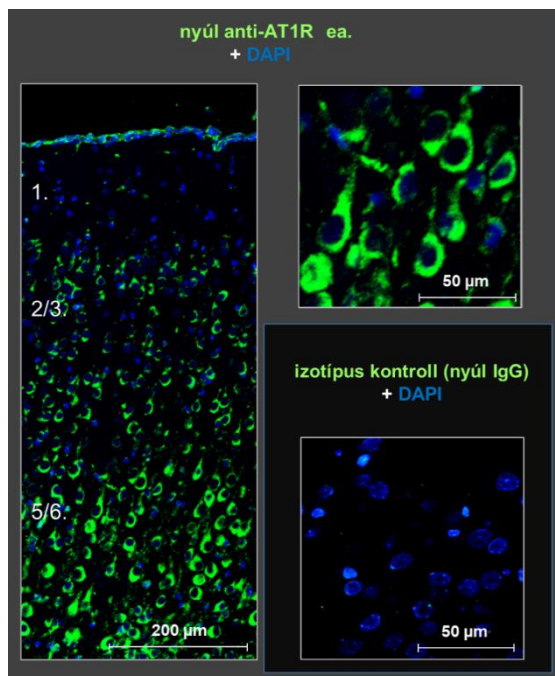
Egy másik IRAP inhibitor, az LVVYP H7 széles koncentrációtartományban, az Ang IV-hez hasonlóan, szintén gátolja az NMDA áramokat 9-12 napos patkány PFC V. rétegében, a piramis sejtek egy csoportjában. 10 nM-s koncentrációnál átlagosan $67,53 \pm 6,33$ %-s T_3/T_2 arányt észleltünk 6/14-db, 100 nM-nál $73,46 \pm 6,85$ %-t 5/14 db, 1 μ M-nál $67,43 \pm 0,22$ %-t 2/6 db sejt esetén. 1 nM-s koncentrációnál a T_3/T_2 arány nem változott.



6. ábra. Az LVVYP H7 különböző koncentrációinak (1 nM - 1 μ M) gátló hatása az NMDA áramokra a PFC V. réteg piramissejtjeiben, 9-12 napos patkányban. A T₃-nál mért válaszokat a T₂-nél mérthez normalizáltuk. *n* kísérlet átlaga $\pm$ SEM. A fehér oszlopokon (kontroll) az összes vizsgált sejt, a piros oszlopokon (LVVYP-H7) a reagáló sejtek száma látható. *p* a szignifikanciát jelöli, * *p* < 0,01.

4.2.5. Az AT1R fehérje szinten expresszálódik a PFC-ben

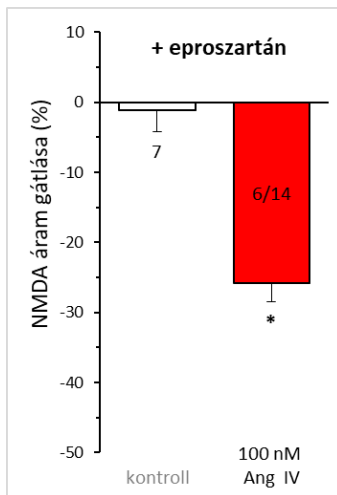
Immunhisztokémiai vizsgálatokkal kimutattuk az AT1R jelenlétét 10 napos patkányok PFC-jében. Nagymértékű expresszió volt megfigyelhető a II-III. és az V-VI. sejtrétegekben, illetve az V. réteg piramis morfológiájú sejtjeiben.



7. ábra. Az AT1R fehérje szintű expressziója 10 napos patkány PFC-ben. Az immunhisztokémiai vizsgálatnál az AT1R megjelenítésére anti-AT1R nyúl poliklonális antitestet, kontrollnak AT1R blokkoló peptidet, ellenfestésként DAPI-t használtunk. (bal) A PFC egésze. A számok a PFC rétegeit mutatják. Mérték: 200 μm . Markáns expresszió a II-III. és az V-VI. sejtrétegekben. (jobb felső) A PFC ötödik rétege. Mérték: 50 μm . Markáns expresszió piramis morfológiájú sejtekben. (jobb alsó) A PFC ötödik rétege. Mérték: 50 μm . Izotípus kontroll.

4.2.6. Az AT1R antagonistá eproszartán nem függeszti fel az Ang IV NMDA áramokra kifejtett gátló hatását

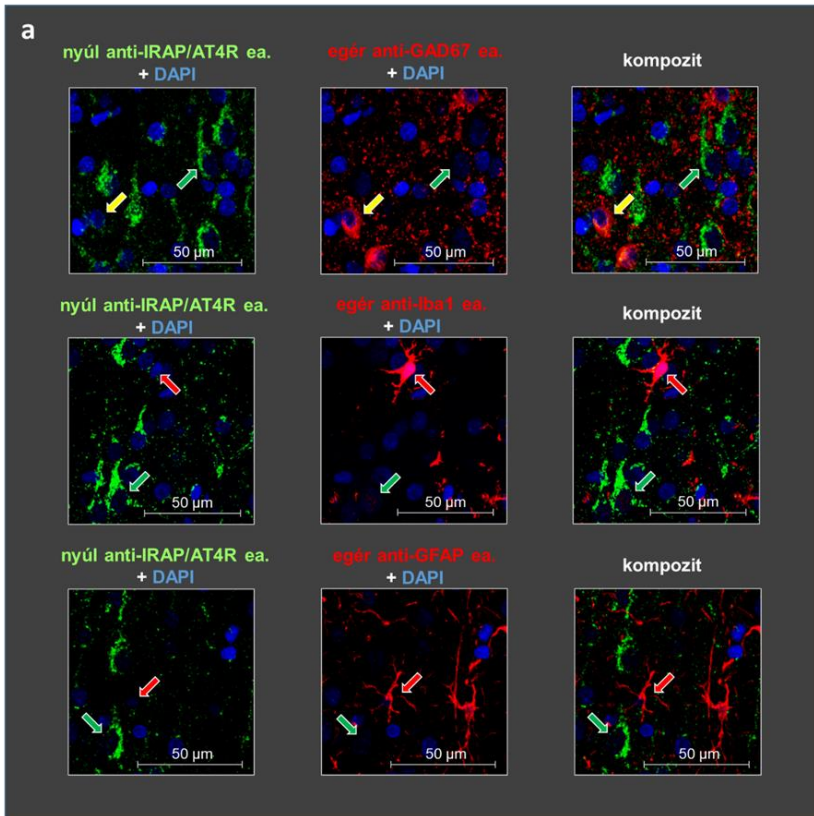
Az AT1R antagonistá eproszartán 1 μM -s koncentrációban nem függesztette fel az Ang IV NMDA áramokra kifejtett gátló hatását 9-12 napos patkány PFC V. rétegében, a piramissejtek egy csoportjában. Ang IV 100 nM-s koncentrációjánál átlagosan $74,23 \pm 2,74\%$ -s T_3/T_2 arányt észleltünk 6/14 db sejt esetén.

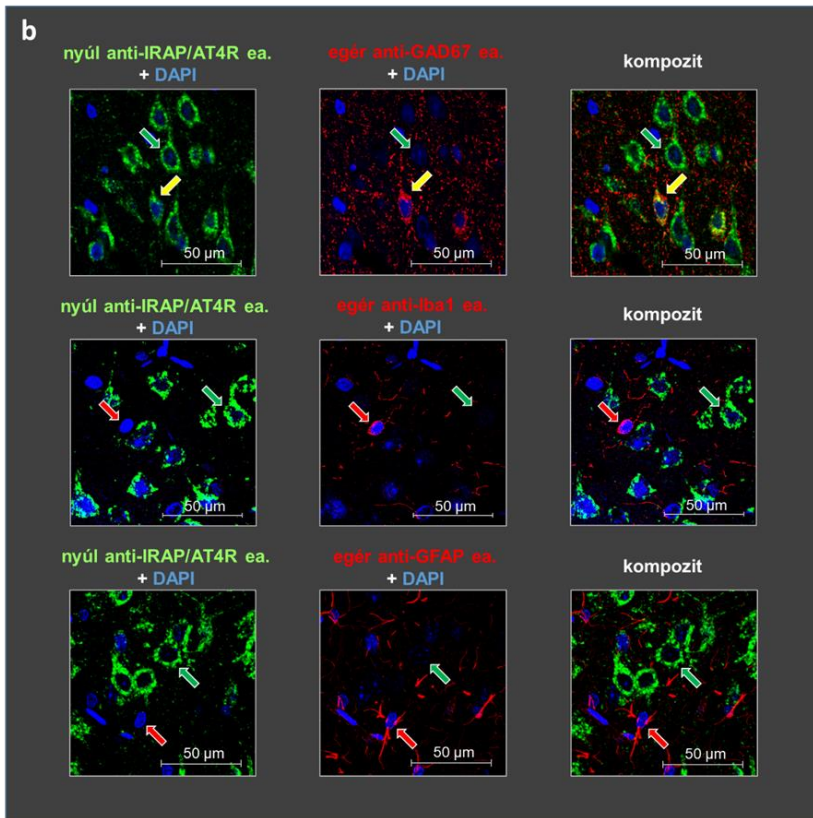


8. ábra. Eproszartán hatása az Ang IV NMDA áramokra kifejtett gátló hatására a PFC V. réteg piramissejtjeiben. A T_3 -nál mért válaszokat a T_2 -nél mérthez normalizáltuk. n kísérlet átlaga $\pm$ SEM. A fehér oszlopokon (kontroll) az összes vizsgált sejt, a piros oszlopokon (Ang IV) a reagáló sejtek száma látható. p a szignifikanciát jelöli, $* p < 0,01$.

4.2.7. Az AT4R/IRAP expresszálódik a piramissejteken és a GABAerg interneuronokban, nem detektálható a microgliákban és az astrocytáknak a PFC V. rétegében

Immunhisztokémiai vizsgálatokkal kimutattuk az AT4R/IRAP jelenlétét 10 napos és 6 hónapos patkányok PFC-jének V. rétegében, különböző sejtípusokban. Nagymértékű expressziót figyeltünk meg piramis morfológiájú neuronokban, illetve GAD67 pozitív GABAerg interneuronokban, ellenben nem detektáltuk IBA1 jelölt microgliákban és GFAP jelölt astrocytáknak.

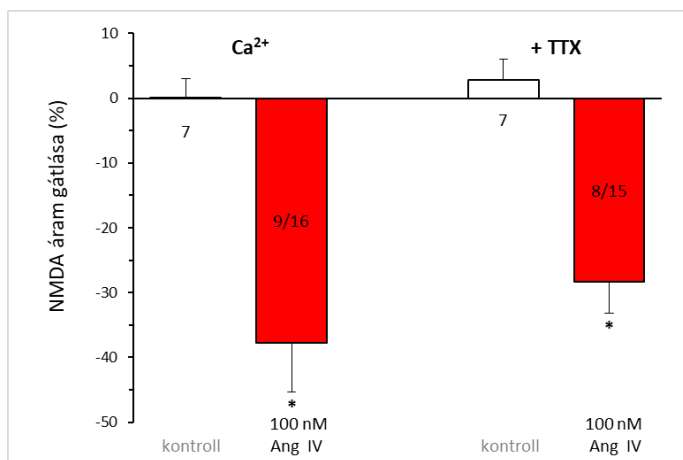




12. ábra. Az AT4R/IRAP fehérje szintű expressziója (a) 10 napos és (b) 6 hónapos patkány PFC V. rétegkülönböző sejttypusokban. Az immunhisztokémiai vizsgálatnál az AT4R/IRAP megjelenítésére anti-IRAP/AT4R nyúl poliklonális antitestet, GABAerg interneuron, microglia és astrocyta markernek anti-GAD67, anti-IBA1 és anti-GFAP egér poliklonális antitestet, kontrollnak nyúl IgG-t, egér IgG1-t, IgG2a-t, ellenfestésként DAPI-t használtunk. A zöld nyilak IRAP pozitív piramis morfológiájú sejtekre, a sárga nyilak IRAP és GAD67 pozitív GABAerg interneuronokra, a piros nyilak IRAP negatív és IBA1 vagy GFAP pozitív microgliákra vagy astrocytákra mutatnak. Mérték: 50 μ m.

4.3.8. Az akciós potenciál gátló tetrodotoxin vagy az exocitózis gátló Ca^{2+} mentes ACSF nem függeszti fel az Ang IV NMDA áramokra kifejtett gátló hatását a PFC V. réteg piramiseltjein

Az akciós potenciál gátló tetrodotoxin (TTX) 0,5 μM -s koncentrációban vagy az exocitózis gátló Ca^{2+} -mentes ACSF által indukált szinaptikus izoláció nem függesztette fel az Ang IV NMDA áramokra kifejtett gátló hatását 9-12 napos patkány PFC V. rétegében, a piramiseltjek egy csoportjában. Ang IV 100 nM-s koncentrációjánál TTX tartalmú ACSF nél átlagosan $71,61 \pm 4,74 \%$ -s T_3/T_2 arányt észleltünk 8/15 db, Ca^{2+} -mentes ACSF nél $62,25 \pm 7,65 \%$ -t 9/16 db sejt esetén.



13. ábra. TTX tartalmú és Ca^{2+} -mentes ACSF hatása az Ang IV NMDA áramokra kifejtett gátló hatására a PFC V. réteg piramiseltjeiben. A T_3 -nál mért válaszokat a T_2 -nél mérthez normalizáltuk. n kísérlet átlaga $\pm$ SEM. A fehér oszlopokon (kontroll) az összes vizsgált sejt, a piros oszlopokon (Ang IV) a reagáló sejtek száma látható. p a szignifikanciát jelöli, * $p < 0,01$

5. Következtetések

5.1. Az angiotenzin II hatásainak vizsgálata

Megerősítettük, hogy az Ang II magasabb koncentrációban (3 μ M) negatív moduláló hatást fejt ki az NMDA áramokra 9-12 napos patkány mPFC V. réteg piramissejtjeinek egy szubpopulációján.

5.2. Az angiotenzin IV hatásainak vizsgálata

Igazoltuk, hogy az Ang IV széles koncentrációtartományban (1 nM - 1 μ M) negatív moduláló hatást fejt ki az NMDA áramokra 9-12 napos patkány mPFC V. réteg piramissejtjeinek egy szubpopulációján.

Igazoltuk, hogy az IRAP/AT4R mRNS és fehérje szinten kifejeződik 10 napos, 3 hónapos és 6 hónapos patkány mPFC-ben, markánsan expresszálódik a PFC II-III. és V-VI. rétegeiben. Illetve, hogy az Ang IV gátló hatását az IRAP inhibitor LVVYP-H7 utánozta. Tehát az inhibíciót az AT4R/IRAP mediálhatja. Igazoltuk, hogy AT1R fehérjéje szinten kifejeződik 10 napos és 6 hónapos patkány mPFC-ben, markánsan expresszálódik a PFC II-III. és V-VI. rétegeiben. Illetve, hogy a gátlást az AT1R antagonistá eprosartán nem befolyásolta. Tehát az inhibíciót nem az AT1R mediálja.

Igazoltuk, hogy az IRAP/AT4R fehérjéje szinten expresszálódik az V. réteg piramis morfológiájú sejtjeiben és GAD67 pozitív GABAerg interneuronjaiban, nem detektálható IBA1 jelölt microgliaiban és GFAP jelölt astrocytaiban. Illetve, hogy az Ang IV gátló hatását sem a TTX-tartalmú, sem a Ca^{2+} -mentes ACSF nem függesztette fel. Tehát az inhibíció interneuronok közvetítése nélkül, a piramis sejteken közvetlenül érvényesül.

6. Saját publikációk jegyzéke

6.1. A doktori tézishoz felhasznált saját publikációk jegyzéke

Hanuska A, Ribiczey P, Kató E, Papp ZT, Varga ZV, Giricz Z, Tóth ZsE, Könczöl K, Zsembery Á, Zelles T, Hársing LG Jr, Köles L: Potentiation of NMDA Receptors by AT1 Angiotensin Receptor Activation in Layer V Pyramidal Neurons of the Rat Prefrontal Cortex. Int J Mol Sci 2024, 25(23):12644

Papp ZT, Ribiczey P, Kató E, Tóth ZsE, Varga ZV, Giricz Z, Hanuska A, Al Khrasani M, Zsembery Á, Zelles T, Hársing LG Jr, Köles L: Angiotensin IV Receptors in the Rat Prefrontal Cortex: Neuronal Expression and NMDA Inhibition. Biomedicines 2024, 13(1): 71

6.2. A doktori tézistől független saját publikációk jegyzéke

Galambos AR, Papp ZT, Boldizsár I, Zádor F, Köles L, Harsing LG Jr, Al Khrasani M: Glycine Transporter 1 Inhibitors: Predictions on Their Possible Mechanisms in the Development of Opioid Analgesic Tolerance. Biomedicines 2024, 12(2):421

Bereczki Z, Benczik B, Balogh OM, Marton S, Puhl E, Pétervári M, Váczy Földi M, Papp ZT, Makkos A, Glass K, Locquet F, Euler G, Schulz R, Ferdinandy P, Ágg B: Mitigating off-target effects of small RNAs: conventional approaches, network theory and artificial intelligence. Br J Pharmacol 2025, 182(2):340 379